

La dimetilarginina asimétrica, estructura e implicaciones patológicas

Julio César González Martínez ^{1,2,*}, Dora Cristina González Rodríguez ², Leticia María Figueira De Freitas ³

Recibido: 27 Julio 2009; Aceptado: 26 Noviembre 2009; Publicado: Mayo 2010

RESUMEN

La aterosclerosis, es una enfermedad crónica, sistémica, inmuno- inflamatoria que afecta a la íntima arterial. La disfunción endotelial es la primera fase en la aterosclerosis. La disfunción endotelial está caracterizada por un daño y pérdida de la monocapa celular que cubre el interior de los vasos sanguíneos, denominada endotelio. Uno de los principales mediadores para el mantenimiento de la integridad del endotelio, es el óxido nítrico (ON). La Dimetilarginina asimétrica (DMAA), es un inhibidor endógeno de la enzima sintasa del Óxido Nítrico (SON); se ha sugerido que la DMAA sirve como un marcador de disfunción endotelial en enfermedades cardiovasculares. Asimismo, la DMAA representa un factor de riesgo para mortalidad cardiovascular, progresión de enfermedad crónica renal. Se ha encontrado valores elevados de DMAA en diferentes condiciones como hipercolesterolemia, aterosclerosis, hipertensión, insuficiencia renal crónica, insuficiencia crónica del corazón, diabetes y disfunción eréctil.

Palabras claves: DMAA, ON, SON, enfermedades cardiovasculares.

Asymmetric dimethylarginine, structure and pathological implications

SUMMARY

Atherosclerosis is an immune inflammatory systemic, arterial disease. Endothelial dysfunction is the first stage in atherosclerosis. Atherosclerosis develops because of reactions occurring in vessel wall beginning with response to endothelial injury. Endothelial dysfunction is characterized with impairment and loss of monolayer cells covering the inside of the vessels, which is endothelium. One of the main mediators for the maintenance of the integrity of endothelium is Nitric Oxide (NO). The asymmetric Dimethylarginine (ADMA), is an endogenous inhibitor of the enzyme Nitric Oxide Synthase (NOS). ADMA has been suggested to serve as a biomarker of endothelial dysfunction in cardiovascular diseases. ADMA is a risk factor for endothelial dysfunction, cardiovascular mortality, and progression of chronic kidney disease. Elevated values of ADMA have been found in hypercholesterolemia, atherosclerosis, hypertension, chronic renal insufficiency, heart chronic failure, diabetes and erectile dysfunction.

Key words: ADMA, NO, NOS, cardiovascular diseases.

* Solicitar copia a: jcgonzal@ucv.edu.ve.

1. Centro de Investigaciones Médicas y Biotecnológicas de la Universidad de Carabobo (CIMBUC).

2. Laboratorio de Investigaciones del Postgrado de la Escuela de Bioanálisis (LIPEB). Facultad de Ciencias de la Salud. Universidad de Carabobo. Valencia – Venezuela.

3. Facultad de Farmacia. Universidad Central de Venezuela. Caracas – Venezuela.

Introducción

La aterosclerosis es una enfermedad crónica, sistémica e inflamatoria caracterizada por un engrosamiento de la íntima de arterial, que afecta a millones de personas en el mundo occidental, y puede ocasionar diversos eventos cardiovasculares como infarto, accidentes cerebro-vasculares, entre otros. Está caracterizada por la acumulación progresiva de lípidos, células (linfocitos T, macrófagos y células musculares lisas) y elementos fibróticos en la íntima de las arterias grandes y medias. En la actualidad, los sistemas de salud de los países del mundo occidental gastan cuantiosas sumas en la prevención, diagnóstico y tratamiento de estas enfermedades (1). En las últimas décadas, numerosas investigaciones en este campo han permitido grandes avances en el conocimiento de la fisiopatología de estas enfermedades, y han ayudado a incrementar la vida de los pacientes que padecen de las mismas.

La fisiopatología de la aterosclerosis depende de múltiples factores, tanto genéticos como adquiridos; se cree que los mismos van a contribuir en el proceso patológico, que conlleva transformaciones en una arteria normal, para desarrollar disfunción endotelial progresiva. La disfunción endotelial está caracterizada por un daño y pérdida de la monocapa celular que cubre el interior de los vasos sanguíneos, denominada endotelio. Existe la hipótesis, donde la pérdida de la función endotelial normal, es el paso fundamental del inicio del proceso aterosclerótico. En este modelo conceptual la exposición constante del endotelio a factores de riesgo, conduce secuencialmente a la disfunción endotelial, seguido del aumento del espesor de la capa íntima y media, estenosis arterial y ruptura de la placa, produciendo trombosis vascular.

El endotelio tiene una importancia fundamental en el mantenimiento de la integridad vascular; ya que el mismo sintetiza diversos factores paracrinis, que producen vasodilatación y vasoconstricción; así como otros factores que median la vía hemostática. Uno de los productos sintetizados por el endotelio es el óxido nítrico (ON), el cual es un compuesto que causa vasodilatación. Diversos estudios realizados en modelos animales, sujetos normales así como en pacientes, han demostrado la importancia de este compuesto sobre la función endotelial (2); ya que, el ON no sólo influye en el tono vascular, sino que además inhibe la proliferación de las células musculares lisas, la agregación plaquetaria, y la adherencia y migración de células inflamatorias del espacio vascular al interior de la pared arterial. Asimismo es conocido que la producción deficiente de ON, constituye un factor de riesgo para sufrir enfermedades cardiovasculares (3,4).

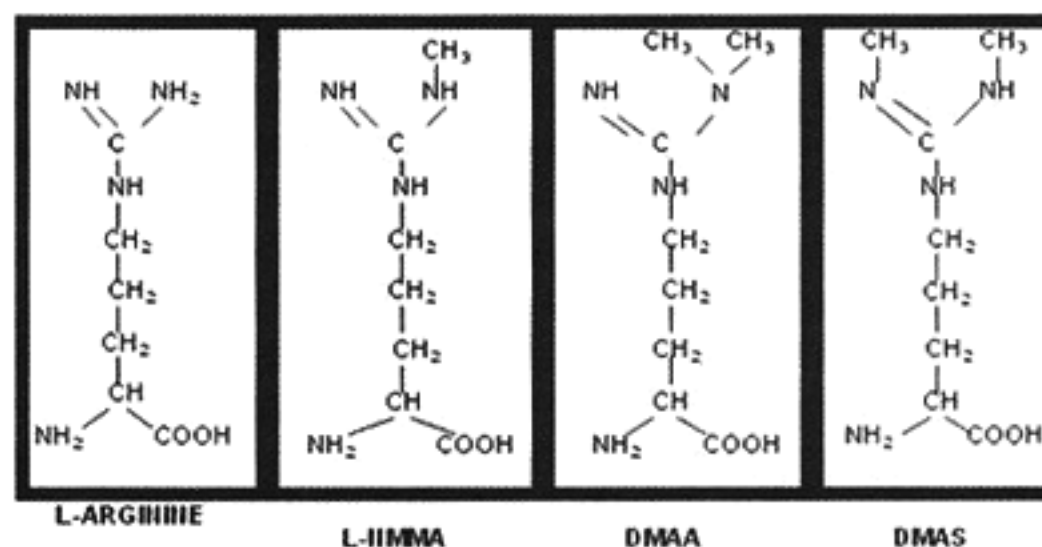
También se han descrito otros factores que contribuyen a la regulación normal del endotelio vascular, uno de ellos es la sintasa del ON (SON) cuyos niveles son regulados por

inhibidores endógenos conocido como la dimetilarginina asimétrica (DMAA) y la N- monometil-L-arginina (L-NMMA) (5). Los niveles plasmáticos de la DMAA son diez veces mayores que la NMMA (6-8).

DMAA

La DMAA, es un aminoácido producido naturalmente, que se encuentra en varios tejidos, y que circula en el plasma y se excreta por la orina (9,10). La DMAA se sintetiza a partir de la metilación de residuos de arginina de proteínas, por la acción de la enzima arginina metiltransferasa (MTsAP). Se han encontrados 2 tipos de estas enzimas, la tipo 1 cataliza la formación de DMAA, mientras que la tipo 2 cataliza la formación de DMAA y la formación de una molécula simétrica de dimetil arginina (DMAS). Los dos tipos de MTsAP también pueden monometilar, produciendo la formación de NMMA (11-13). En la Figura 1, se muestran las estructuras de la L-Arginina, L-NMMA, DMAA, DMAS.

Figura 1. Estructura de la Arginina, L-NMMA, DMAA y DMAS.



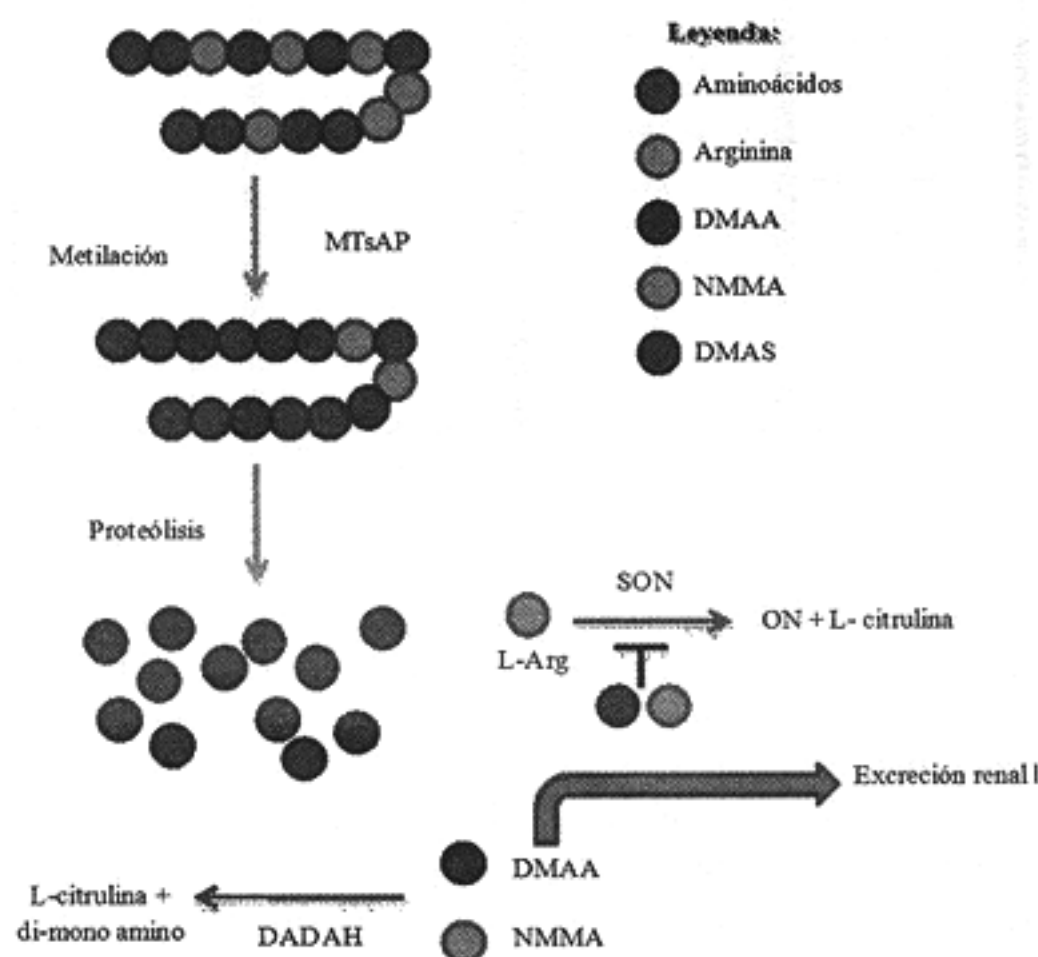
La DMAA, inhibe las 3 isoformas de la SON y tiene la misma fuerza de inhibición que el L-NMMA; por su parte, el DMSA no la inhibe. La inhibición de la SON *in Vitro* se produce en un amplio rango de concentraciones de DMAA; asimismo, dicha inhibición también ha sido reportada *in Vivo* (14,15). También se han medido los niveles plasmáticos de DMAA *in Vivo* en pacientes con enfermedades cardiovasculares o enfermedades metabólicas, encontrando niveles elevados de DMAA y disminución de ON (16-19).

Las concentraciones plasmáticas de DMAA en sujetos normales, por diferentes técnicas analíticas caen en un rango pequeño de 0,4 a 0,7 $\mu\text{mol/L}$; en cambio las concentraciones de L-arginina en plasma de sujetos normales se encuentran en un rango elevado, que se encuentran entre 60-140 $\mu\text{mol/L}$. Actualmente, existen pocas evidencias que demuestran que los niveles elevados de DMAA, son debido al aumento de la metilación de residuos de arginina. La metilación de arginina

en proteínas es un proceso altamente regulado, y las proteínas metiladas tienen un amplio rango de funciones.

La DMAA, se elimina a una tasa de 60 mg/24 horas (300 μ mol/24 horas) (20); de esta cantidad, aproximadamente 50 μ mol/24 horas es excretado por la orina (21), por lo tanto la DMAA se acumula en pacientes con insuficiencia renal. La degradación de DMAA se realiza por medio de la enzima dimetilarginina dimetilaminohidrolasa (DADAH) (22,23); de esta enzima, se han descrito 2 isoformas, la DADAH I predomina en tejidos neuronales, mientras que la DADAH II, predomina en tejidos endoteliales y tejido hepático (24). Asimismo, se ha propuesto que la elevación de DMAA plasmática en enfermedades vasculares se debe a la actividad disminuida de DADAH. En la Figura 2, se muestran las vías de eliminación y de degradación del DMAA y NMMA.

Figura 2. Síntesis, función y excreción de la DMAA. La DMAA es formada por metilación de los residuos de Arg mediante la enzima MTsAP. Tanto la DMAA como la NMMA son inhibidores de la SON. La DMAA es excretada por vía renal.



Efecto de la DMAA

En condiciones experimentales, con concentraciones sub óptimas de L-arginina, o deficiencias de cofactores esenciales para la SON, la actividad enzimática se desacopla; esto significa que la oxidación de L-arginina hasta ON no se completa (25,26).

Molecularmente en condiciones óptimas, lo que sucede en la enzima SON, es que cinco electrones son transferidos del O_2 a

L-arginina en 2 pasos de una reacción acoplada de oxidación-reducción en los dos dominios de la enzima SON produciendo L-citrulina y ON.

En condiciones sub óptimas, el flujo de electrones dentro de los 2 dominios de SON se interrumpe y el O_2 actúa como un aceptor de electrones. Esto permite que la enzima SON sea una enzima productora de radicales superóxido (O_2^-).

En cultivos de células endoteliales humanas, se produce O_2^- en la presencia de DMAA, conduciendo a la hipótesis de que DMAA puede interrumpir la producción de ON, por la enzima SON y desacoplar así la enzima, resultando en una disminución de la formación de ON a partir de O_2 . Esto a su vez conduce a la activación de factores de transcripción, que sobre regulan la expresión de moléculas de adhesión endotelial, y de allí incrementan la adhesividad de monocitos al revestimiento vascular (27).

Por lo tanto, en cultivo de células endoteliales humanas, en presencia de elevadas concentraciones de DMAA, se ha evidenciado incremento en la expresión de moléculas de adhesión celular, y un aumento de la adhesión de leucocitos a las células endoteliales. Igualmente, cuando los monocitos aislados de sangre periférica de pacientes con factores de riesgo cardiovascular, son incubados en cultivo de células endoteliales humanas, se observa que los monocitos provenientes de pacientes hipercolesterolémicos se adhieren más fuertemente al endotelio, que los monocitos provenientes de controles normo colesterolémicos; esta hiper adhesividad se normaliza al agregar L-arginina (28); lo cual indica que hay un desplazamiento competitivo de la L-arginina endógena por el DMAA, que causa los cambios en la adhesividad de los monocitos.

Sin embargo, algunos estudios experimentales en animales expuestos a dieta hiper colesterolémica, revelan que los niveles de DMAA se elevan rápidamente, sin observarse cambios apreciables en la integridad del endotelio arterial (29).

Métodos para medir los niveles de DMAA

El primer método utilizado para evaluar las concentraciones sanguíneas (plasma) de DMAA, fue la cromatografía de alta presión (HPLC); por medio de este método se puede separar el DMAA y su NMMA (30,31). También se han desarrollado métodos basados en la espectrometría de masa, y recientemente se ha desarrollado y validado un método cromatográfico, con interacción hidrofílica acoplado a un espectrómetro de masa, para la separación y cuantificación (5 minutos de duración) simultánea de L-arginina, DMAA y DMAS (32); sin embargo aunque son métodos muy buenos, son muy costosos, debido a su tecnología compleja; motivo por el cual se dificulta su implementación en laboratorios clínicos de manera rutinaria. Sin embargo, también se han desarrollado

inmunoensayos (ELISA) que han sido validados con el HPLC, demostrando buenos resultados de exactitud, precisión y especificidad; contando adicionalmente con la ventaja de que son métodos relativamente económicos, y que pueden ser utilizados con mínimos recursos, pudiendo por lo tanto, ser fácilmente implementados en laboratorios clínicos.

DMAA en enfermedades

Se han encontrado niveles elevados de DMAA en enfermedades metabólicas y cardiovasculares, en estas enfermedades los niveles de DMAA están asociados a disfunción endotelial de allí la importancia para el pronóstico de eventos cardiovasculares.

Enfermedad arterio coronaria

Diferentes estudios han evaluado la DMAA en diversos tipos de patologías cardiovasculares, y su relación con un evento cardiovascular futuro. De hecho, en pacientes a quienes les evaluaron los niveles de DMAA, seis semanas después de sufrir un ataque agudo coronario, y a quienes los valores de DMAA se encontraban todavía elevados, tuvieron un riesgo mayor de sufrir otro ataque a *posterio* (33-36). Por su parte, los pacientes que tienen un 95 % de obstrucción o más en una arteria epicárdica coronaria, tienen niveles elevados de DMAA, asociado a un deficiente desarrollo coronario colateral; en este sentido han especulado que la DMAA puede ser responsable, por la diferencia observada en el desarrollo de los vasos colaterales entre diferentes pacientes con enfermedad arterio coronaria; por lo que parece ser necesaria la concentración óptima de ON para el funcionamiento de la célula endotelial, y así el desarrollo de vasos colaterales en esta enfermedad (36).

En pacientes con el síndrome cardíaco X también se ha encontrado niveles elevados de DMAA y un aumento en el grosor de la capa íntima-media, reflejando la presencia de aterosclerosis subclínica. Estos hallazgos indican que además de la angina microvascular; la disfunción endotelial y la presencia de aterosclerosis, también contribuyen a la etiopatogenia del fenómeno síndrome cardíaco X (37).

Por lo tanto, estos hallazgos sugieren que, la DMAA es un marcador de riesgo para la enfermedad arterio coronaria, y puede proveer información adicional, a la suministrada por los indicadores de riesgos cardíacos tradicionales.

Enfermedad oclusiva de arterias periféricas

Pacientes con enfermedad oclusiva de arterias periféricas (EOAP), tienen niveles elevados de DMAA (dependiendo del estado clínico de los mismos), con respecto a sujetos aparentemente sanos de la misma edad, con función vascular normal (38). Asimismo, la excreción urinaria de los metabolitos de ON, se ve disminuida, dependiendo del grado de la enferme-

dad. Esta condición puede ser revertida por medio de la administración de L-arginina (39).

Insuficiencia crónica del corazón

Algunos estudios, han reportado elevaciones de DMAA en pacientes con insuficiencia cardíaca crónica (40). En insuficiencia sistólica crónica del corazón, la acumulación de metabolitos metilados de arginina está asociado a la presencia de disfunción diastólica del corazón (40).

Hipertensión

En pacientes con hipertensión arterial, también se han encontrado valores elevados de DMAA, y al mismo tiempo la excreción urinaria de metabolitos del ON está disminuida (41). El tratamiento con Nebivolol, un β bloqueante cardio selectivo, ha demostrado disminuir los niveles séricos de DMAA, y mejorar la disfunción endotelial en pacientes con hipertensión arterial (42).

Algunos estudios en animales, sugieren el papel fisiopatológico de DMAA en la regulación normal de la presión sanguínea. Otro estudio en humanos (43), ha encontrado asociación entre los niveles de DMAA y la hipertrofia del ventrículo izquierdo.

Anormalidades del metabolismo lipídico

En pacientes hipercolesterolémicos, se ha observado elevación de la concentración de DMAA, con respecto a la encontrada en pacientes normocolesterolémicos, a pesar de que estos pacientes no presentaban enfermedades cardiovasculares; estos resultados pueden sugerir que, el aumento de los niveles de DMAA, se presenta en las etapas tempranas de la aterosclerosis, contribuyendo posiblemente, en su progresión y ulterior establecimiento. Estos resultados están soportados por estudios donde la disfunción endotelial en pacientes hipercolesterolémicos puede ser revertida por medio de la suplementación de L-arginina en la dieta. Igualmente la hipertrigliceridemia, puede conducir a la elevación de DMAA produciendo disfunción endotelial (44).

Diabetes

En pacientes diabéticos tipo II, se ha encontrado niveles elevados de DMAA (45-48), los investigadores proponen la hipótesis de que, el mecanismo molecular de elevación del DMAA, puede ser el estrés oxidativo inducido por la desregulación de la enzima DDAH (49), o por el mecanismo dependiente de la angiotensina II (50,51).

Pre-eclampsia

La pre-eclampsia tiene tres síntomas clínicos principales, como lo son la hipertensión, el edema y la proteinuria, trayendo como consecuencia el riesgo de retardo de crecimiento intrauterino y aborto, el cual se cree es el resultado de la deficiencia en la

perfusión placentaria. En varios estudios (52,53), se han encontrado valores elevados de DMAA, en mujeres propensas a sufrir pre-eclampsia, de tal manera que puede ser considerado como un marcador para esta patología; asimismo es necesario recordar, que en la mujer embarazada existe una función endotelial normal, en cambio en la pre-eclampsia existe disfunción endotelial uterina.

Disfunción eréctil

En algunos pacientes con disfunción eréctil, la vía L-arginina $\Rightarrow$ ON $\Rightarrow$ GMPc, se encuentra alterada (54); este defecto bioquímico a menudo es causado por algunos factores de riesgos subyacentes en enfermedades cardiovasculares.

Algunos estudios (55,56), han mostrado que la disfunción eréctil en algunos pacientes con niveles bajos de excreción de metabolitos de ON, puede restablecerse con la suplementación de L-arginina; indicando que estos pacientes tienen un defecto en la vía de producción ON debido al aumento de niveles de DMAA.

Estudios clínicos recientes muestran que, los pacientes con disfunción eréctil enfermos, con diabetes o alguna enfermedad arterio coronaria, además de concentraciones elevadas de DMAA, tienen niveles disminuidos de L-arginina. De allí que sea importante determinar los niveles de DMAA en pacientes con esta patología, para discriminar su origen y enfocar su correcta terapia (57).

Insuficiencia renal crónica

Numerosos estudios (58), han confirmado la elevación de DMAA en la insuficiencia renal crónica; y en el estado final de esta enfermedad, se ha confirmado que el aumento del DMAA, es causado parcialmente por la deficiente eliminación de DMAA durante la hemodiálisis (59). Elevadas concentraciones de DMAA contribuyen a disfunción endotelial, que pueden en parte ser responsables, de la alta morbilidad cardiovascular en estas enfermedades (60,61).

La determinación de DMAA, permite conocer el pronóstico y progreso de la enfermedad crónica renal (62). Y tomando en cuenta que, la sangre es capaz de liberar cantidades fisiológicas significantes de DMAA por vía proteolítica; la liberación de DMAA no regulada de reservorios sanguíneos, puede contribuir a la característica elevación de DMAA en enfermedades renales crónicas (63).

Rechazo de trasplante renal

Los niveles elevados de DMAA sugieren un papel para la disfunción endotelial en el desarrollo de episodios de rechazo agudo (64,65).

Tratamiento de la elevación de DMAA

El tratamiento en patología cardiovascular debe dirigirse a revertir los efectos de la elevación de DMAA. Uno de esos tratamientos es reducir los niveles de DMAA y se puede lograr por medio de la L-arginina, la cual desplaza la DMAA y activa la SON. La farmacoterapia disponible actualmente puede reducir los niveles de DMAA, como se ha observado en diabéticos medicados con Metformina (66), Rosiglitazona en pacientes con resistencia a la insulina (67), Captopril y Enalapril (inhibidores de la enzima convertidora de angiotensina) y Losartán y Valsartán (antagonista de los receptores de angiotensina II) en pacientes hipertensos (68). Los estrógenos solos o con progestágenos, aumentan la expresión de la DDAH (69), las Estatinas, sobre regulan la expresión del gen de la SON endotelial; de hecho, en pacientes con valores de DMAA elevados, la SON no ejerce su función esperada, ya que su actividad está bloqueada (70,71); por lo que las Estatinas sólo mejoran la vasodilatación dependiente del endotelio, cuando se las administra asociada a L-arginina en la dieta (72).

En pacientes con deficiencia de la hormona de crecimiento (HG), el remplazo de HG contribuye a disminuir, en algún grado el riesgo cardiovascular, los niveles de DMAA y mejorar el cociente Arginina/DMAA y la disfunción endotelial (73). Recientemente se ha encontrado que el fármaco Telmisartán utilizado en hipertensión, disminuye los niveles de DMAA presumiblemente vía la activación (por receptor gamma) de un activador proliferador de peroxisomas sugiriendo que este agente mejora la función vascular vía su efecto pleiotrópico, un mecanismo que es diferente de su efecto hipotensivo (74).

Conclusiones

La DMAA juega un importante papel en la regulación del tono vascular, al actuar como inhibidor de la síntesis del ON, y así aumentar la resistencia vascular, disminuyendo el flujo sanguíneo. Por otra parte, el DMAA es promotor de la aterogénesis, al inhibir la producción de ON que es un vasoprotector. De este modo, la elevación de DMAA incrementa la progresión de aterosclerosis y aumenta el riesgo de enfermedades cardiovasculares. El DMAA se ha convertido en marcador de riesgo cardiovascular.

Referencias

1. American Heart Association. Heart Disease and Stroke Statistics—2004 Update. Dallas, Tex: American Heart Association; 2003.
2. Cooke JP, Dzau VJ. Nitric oxide synthase: role in the genesis of vascular disease. *Annu Rev Med.* 1997. 48:489–509.
3. Schachinger V, Britten MB, Zeiher AM. Prognostic impact of coronary vasodilator dysfunction on adverse long-term outcome of coronary heart disease. *Circulation.* 2000. 101:1899–1906.

4. Suwaidi JA, Hamasaki S, Higano ST, et al. Long-term follow-up of patients with mild coronary artery disease and endothelial dysfunction. *Circulation*. 2000. 101: 948-954.
5. Gokce N, Keaney JF Jr, Hunter LM, et al. Predictive value of noninvasively determined endothelial dysfunction for long-term cardiovascular events in patients with peripheral vascular disease. *J Am Coll Cardiol*. 2003. 41:1769-1775.
6. Vallance P, Leone A, Calver A, et al. Accumulation of an endogenous inhibitor of nitric oxide synthesis in chronic renal failure. *Lancet*. 1992. 339:572-575.
7. Altan S. Asymmetric dimethylarginine, NO and collateral growth. *Ana do lu Kar di yol Derg* 2009; 9: 417-420.
8. Böger RH. The Pharmacodynamics of L-Arginine. *J. Nutr.* 2007; 137: 1650S-1655S.
9. Cooke JP, Dzau VJ. Nitric oxide synthase: role in the genesis of vascular disease. *Annu Rev Med*. 1997. 48:489-50.
10. Von der Leyen HE, Gibbons GH, Morishita R, et al. Gene therapy inhibiting neointimal vascular lesion: *in vivo* transfer of endothelial cell nitric oxide synthase gene. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1995. 92:1137-1141.
11. Oblanyo O, Osborne TC, Thompson PR. Kinetic Mechanism of protein Arginine Methyltransferase 1. *Biochemistry*. 2008. 5:700-710.
12. McBride AE, Silver PA. State of the Arg: protein methylation at arginine comes of age. *Cell*. 2001. 106:5-8.
13. Zakrzewicz D, Eickelberg O. From arginine methylation to ADMA: A novel mechanism with therapeutic potential in chronic lung diseases. *BMC Pulmonary Medicine* 2009; 9:1-7.
14. Boger RH, Bode-Boger SM, Thiele W, et al. Biochemical evidence for impaired nitric oxide synthesis in patients with peripheral arterial occlusive disease. *Circulation*. 1997. 95:2068-2074.
15. Boger RH, Bode-Boger SM, Szuba A, et al. Asymmetric dimethylarginine (ADMA): a novel risk factor for endothelial dysfunction: its role in hypercholesterolemia. *Circulation*. 1998. 98:1842-1847.
16. Galán A, Hormiguera X, Rey-Joly C. Asymmetric dimethylarginine as cardiovascular risk factor. *Med Clin (Barc)*. 2008. 131 (7):271-275.
17. Kurose I, Wolf R, Grisham MB, Granger DN. Effects of an endogenous inhibitor of nitric oxide synthesis on postcapillary venules. *Am. J. Physiol.* 1995. 268:H2224-H2231.
18. Tsikas D, Sandmann J, Böger RH, Gutzki FM, Mayer B, Frölich JC. Assessment of nitric oxide synthase activity by gas chromatography-mass-spectrometry. *J Chromatogr. B* 2000. 742:143-153.
19. Szuba A, Podgórski M. Asymmetric dimethylarginine (ADMA) a novel cardiovascular risk factor – evidence from epidemiological and prospective clinical trials. *Pharmacological Report* 2006; 58: 16 – 20.
20. Achan V, Broadhead M, Malaki M, et al. Asymmetric dimethylarginine causes hypertension and cardiac dysfunction in humans and is actively metabolized by dimethylarginine dimethylaminohydrolase. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2003. 23:1455-1459.
21. Vallance P, Leone A, Calver A, et al. Accumulation of an endogenous inhibitor of nitric oxide synthesis in chronic renal failure. *Lancet*. 1992. 339:572-575.
22. Murray-Rust J, Leiper J, McAlister M, et al. Structural insights into the hydrolysis of cellular nitric oxide synthase inhibitors by dimethylarginine dimethylaminohydrolase. *Nat Struct Biol*. 2001. 8:679-686.
23. Palm F, Onozato M, Luo Z, Wilcox C. Dimethylarginine dimethylaminohydrolase (DDAH): expression, regulation, and function in the cardiovascular and renal systems. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2007; 293: H3227-H3245.
24. Richir MC, Bouwman RH, Teerlink T, et al. The Prominent Role of the Liver in the Elimination of Asymmetric Dimethylarginine (ADMA) and the Consequences of Impaired Hepatic Function. *J Parenter Enteral Nutr* 2008. 32(6):613-621.
25. Vasquez-Vivar J, Kalyanaraman B, Martasek P, et al. Superoxide generation by endothelial nitric oxide synthase: the influence of cofactors. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1998. 95:9220-9225.
26. Druhan L, Forbes S, Pope A, Chen Ch, Zweler JL, Cardounel AJ. Regulation of eNos-Derived Superoxide by Endogenous Methylarginines. *Biochemistry*, 2008. 47(27):7256-7263.
27. Boger RH, Bode-Boger SM, Tsao PS, et al. An endogenous inhibitor of nitric oxide synthase regulates endothelial adhesiveness for monocytes. *J Am Coll Cardiol*. 2000. 36:2287-2295.
28. Chan J, Böger R, Bode-Böger S, et al. Asymmetric dimethylarginine increases mononuclear cell adhesiveness in hypercholesterolemic humans. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2000; 20:1040-1050.
29. Böger RH, Bode-Böger SM, Mügge A, et al. Supplementation of hypercholesterolaemic rabbits with L-arginine reduces the vascular release of superoxide anions and restores NO production. *Atherosclerosis*. 1995. 117:273-284.
30. Blackwell S, O'Reilly DS, Talwar DK. HPLC analysis of asymmetric dimethylarginine (ADMA) and related arginine metabolites in human plasma using a novel non-endogenous internal standard. *Clin Chim Acta*. 2008:397:53-56.
31. Teerlink T. HPLC analysis of ADMA and other methylated L-arginine analogs in biological fluids. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci*. 2007.851(1-2):21-29.
32. D'Apolito O, Paglia G, Tricarico F, Garofalo D, Pilotti A, Lamacchia O, Cignarelli M, Corso G. Development and validation of a fast quantitative method for plasma dimethylarginines analysis using liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Clin Biochem*. 2008. 41(16-17):1391-1395.
33. Lu TM, Ding YA, Lin SJ, Lee WS, Tai HC. Plasma levels of asymmetrical dimethylarginine and adverse cardiovascular events after percutaneous coronary intervention. *Eur Heart J*. 2003. 24:1912-1919.
34. Schnabel R, Blankenberg S, Lubos E, Lackner KJ, Rupprecht HJ, Espinola-Klein C, Jachmann N, Post F, Peetz D, Bickel C, Cambien F, Tiret L, Münzel T. Asymmetric Dimethylarginine and the Risk of Cardiovascular Events and Death in Patients With Coronary Artery Disease: Results from the AtheroGene Study. *Circ. Res*. 2005. 97:e53-e59.
35. Krempf TK, Maas R, Sydow L, Meinertz T, Böger RH, Kähler J. Elevation of asymmetric dimethylarginine in patients with unstable angina and recurrent cardiovascular events. *Eur Heart J*. 2005. 26:1846-1851.

36. Kocaman SA, Sahinarslan A, Biberoglu G, Hasanoglu A, Akyel A, Timurkaynak T, Cengel A. Asymmetric dimethylarginine and coronary collateral vessel development. *Coron Artery Dis*. 2008; 19:469-474.
37. Sen N, Poyraz F, Tavil Y, Yazici HU, Turfan M, Hýzal F, Topal S, Erdamar H, Cakir E, Yalçýn R, Cengel A. Carotid intima-media thickness in patients with cardiac syndrome X and its association with high circulating levels of asymmetric dimethylarginine. *Atherosclerosis* 2008; 201:220-225.
38. Boger RH, Bode-Boger SM, Thiele W, Junker W, Alexander K, Frolich J.C. Biochemical evidence for impaired nitric oxide synthesis in patients with peripheral arterial occlusive disease. *Circulation*. 1997; 95:2068-2074.
39. Boger RH, Bode-Boger SM, Thiele W, Creutzig A, Alexander K, Frolich JC. Restoring vascular nitric oxide formation by L-arginine improves the symptoms of intermittent claudication in patients with peripheral arterial occlusive disease. *J Am Coll Cardiol*. 1998; 32:1336-1344.
40. Wilson Tang WH, Tong W, Shrestha K, Wang Z, Levison BS, Delfraio B, Hu B, Troughton RW, Klein AL, Hazen SL. Differential effects of arginine methylation on diastolic dysfunction and disease progression in patients with chronic systolic heart failure. *Eur Heart J*. 2008; 29:2506 - 2513.
41. Surdacki A, Nowicki M, Sandmann J, et al. Reduced urinary excretion of nitric oxide metabolites and increased plasma levels of asymmetric dimethylarginine in men with essential hypertension. *J Cardiovasc Pharmacol*. 1999; 33:652-658.
42. Pasini AF, Garbin U, Stranieri C, et al. Nebivolol Treatment Reduces Serum Levels of Asymmetric Dimethylarginine and Improves Endothelial Dysfunction in Essential Hypertensive Patients. *Am J Hypertens*. 2008; 21:1251-1257.
43. Zoccali C, Mallamaci F, Maas R, et al. Left ventricular hypertrophy, cardiac remodelling and asymmetric dimethylarginine (ADMA) in hemodialysis patients. *Kidney Int*. 2002; 62:339-345.
44. Lundman P, Eriksson MJ, Stuhlinger M, et al. Mild-to-moderate hypertriglyceridemia in young men is associated with endothelial dysfunction and increased plasma concentrations of asymmetric dimethylarginine. *J Am Coll Cardiol*. 2001; 38:111-116.
45. Fard A, Tuck CH, Donis JA, et al. Acute elevations of plasma asymmetric dimethylarginine and impaired endothelial function in response to a high-fat meal in patients with type 2 diabetes. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2000; 20:2039-2044.
46. Abbasi F, Asagmi T, Cooke JP, et al. Plasma concentrations of asymmetric dimethylarginine are increased in patients with type 2 diabetes mellitus. *Am J Cardiol*. 2001; 88:1201-1203.
47. Yamagishi S, Ueda S, Nakamura K, et al. Role of asymmetric dimethylarginine (ADMA) in diabetic vascular complications. *Curr Pharm Des*. 2008; 14(25):2613-2618.
48. Pereira EC, Ferderbar S, Bertolami MC, et al. Biomarkers of oxidative stress and endothelial dysfunction in glucose intolerance and diabetes mellitus. *Clin Biochem* 2008; 41(18):1454-14.
49. Lin KY, Ito A, Asagami T, et al. Impaired nitric oxide synthase pathway in diabetes mellitus: role of asymmetric dimethylarginine and dimethylarginine dimethylaminohydrolase. *Circulation*. 2002;106: 987-992.
50. Ito A, Egashira K, Narishige T, Muramatsu K, Takeshita A. Angiotensin-Converting Enzyme Activity is Involved in the Mechanism of Increased Endogenous Nitric Oxide Synthase Inhibitor in Patients With Type 2 Diabetes Mellitus. *Circ J*. 2002; 66:811-815.
51. Krzyzanowska K, Mittermayer F, Wolzt M, Schernthaner G. ADMA, cardiovascular disease and diabetes. *Diabetes Res Clin Pract*. 2008; 82: 150-160.
52. Savvidou M, Hingorani A, Tsikas D, Frolich J, Vallance P, Nicolaides K. Endothelial dysfunction and raised plasma concentrations of asymmetric dimethylarginine in pregnant women who subsequently develop pre-eclampsia. *Lancet*. 2003; 361:1511-1517.
53. Ellis J, Wennerholm UB, Bengtsson A, Lilja H, Pettersson A, Sultan B, Wennergren M, Hagberg H. Levels of dimethylarginines and cytokines in mild and severe Preeclampsia. *Acta Obst Gynecol Scand*. 80: 602-608.
54. Maas R, Schwedhelm E, Albsmeier J, Böger RH. The pathophysiology of erectile dysfunction related to endothelial dysfunction and mediators of vascular function. *Vasc Med*. 2002; 7:213-225.
55. Wierzbicki AS, Solomon H, Lumb PJ, et al. Asymmetric dimethyl arginine levels correlate with cardiovascular risk factors in patients with erectile dysfunction. *Atherosclerosis* 2006; 185(2):421-425.
56. Maas R, Schwedhelm E, Albsmeier J, et al. The pathophysiology of erectile dysfunction related to endothelial dysfunction and mediators of vascular function. *Vasc Med*. 2002 ;7(3): 213-225.
57. Masuda H. Significance of nitric oxide and its modulation mechanisms by endogenous nitric oxide synthase inhibitors and arginase in the micturition disorders and erectile dysfunction. *Int J Urol*. 2008; 15(2):128-34.
58. Böger RH, Zoccali C. ADMA: A novel risk factor that explains excess cardiovascular event rate in patient with end-stage renal disease. *Atherosclerosis Suppl*. 2003; 4:23-28.
59. Schnabel R, Blankenberg S, Lubus E, Lackner KJ, Rupprecht HJ, Espinola-Klein C, Jachmann F, Peetz D, Bickel C, Cambien F, Tiret L, Munzel T. Asymmetric dimethylarginine and the risk of cardiovascular events and death in patients with coronary artery disease: results from the atheroGene Study. *Circ Res*. 2005; 97:e53-59.
60. Kielstein JT, Zoccali C. Asymmetric dimethylarginine: a novel marker of risk and a potential target for therapy in chronic kidney disease. *Curr Opin Nephrol Hypertens*. 2008; 17(6):609-615.
61. Mallamaci F, Zocali C. Clinical implications of elevated asymmetric dimethylarginine in chronic kidney disease and end-stage renal disease. *J Ren Nutr*.
62. Kielstein JT, Martens-Lobenhoffer J, Vollmer S, et al. L-Arginine, ADMA, SDMA, creatinine, MDRD formula: detour to renal function testing. *J Nephrol* 2008; 21(6): 959-961.
63. Billecke SS, D'Alecy LG, Platel R, et al. Blood content of asymmetric dimethylarginine: new insights into its dysregulation in renal disease. *Nephrol Dial Transplant*. 2008; 23:118-132.
64. Esposito C, Grosjean F, Torreggiani M, et al. Increased Asymmetric Dimethylarginine serum levels are associated with acute Rejection in Kidney Transplant Recipients. *Transplant Proc*. 2009; 41(5):1570-1573.

65. Zhang W, Zhou C, Xie J, et al. Serum asymmetric dimethylarginine and endothelial function after renal transplantation. *Zhong Nan Da Xue Xue Bao Xi Xue Ban*. 2009. 34(4):289-294.
66. Asagmi T, Abbasi F, Stuehlinger M, et al. Metformin treatment lowers asymmetric dimethylarginine concentrations in patients with type 2 diabetes. *Metabolism*. 2002; 51:843-846.
67. Stuhlinger MC, Abbasi F, Chu JW, et al. Relationship between insulin resistance and an endogenous nitric oxide synthase inhibitor. *JAMA*. 2002;287: 1420-1426.
68. Delles C, Schneider MP, John S, et al. Angiotensin converting enzyme inhibition and angiotensin II AT1-receptor blockade reduce the levels of asymmetrical N(G), N(G)-dimethylarginine in human essential hypertension. *Am J Hypertens*. 2002. 15(1):590-593.
69. Holden DP, Cartwright JE, Nussey SS, et al. Estrogen stimulates dimethylarginine dimethylaminohydrolase activity and the metabolism of asymmetric dimethylarginine. *Circulation*. 2003. 108:1575-1580.
70. Böger RH. Asymmetric dimethylarginine (ADMA) modulates endothelial function therapeutic implications. *Vasc Med*. 2003. 8:149-151.
71. Janatuinen T, Laakso J, Laaksonen R, Vesalainen R, Nuutila P, Lehtimäki T, et al. Plasma asymmetric dimethylarginine modifies the effect of pravastatin on myocardial blood flow in young adults. *Vasc Med*. 2003. 8:185-189.
72. Böger GI, Maas R, Schwedhelm E, Bierend A, Benndorf R, Kastner M, et al. Improvement of endothelium-dependent vasodilation by simvastatin is potentiated by combination with L-arginine sustained release in patients with elevated ADMA levels. *J Am Coll Cardiol*. 2004. 34:A525.
73. Setola E, Monti LD, Lanzi R, Lucotti P, Losa M, Gatti E, Galluccio E, Oldani M, Fermo I, Giovannelli M, Bosi E, Piatti P. Effects of growth hormone treatment on arginine to asymmetric dimethylarginine ratio and endothelial function in patients with growth hormone deficiency. *Metabolism*. 2008. 57(12):1685-1690.
74. Ono Y, Nataya Y, Bando S, Soeki T, et al. Telemisartan decreases plasma levels of asymmetrical dimethyl-L-arginine and improves lipid and glucose metabolism and vascular function. *Int Heart J*. 2009. 50(1):73-83.